

BF.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-49611

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月23日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 0 1 N 43/20

A 0 1 N 43/20

// C 0 7 K 14/435

C 0 7 K 14/435

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平9-273639
(22) 出願日 平成 9 年(1997) 9 月19日
(31) 優先権主張番号 特願平9-163339
(32) 優先日 平 9 (1997) 6 月 4 日
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000231648
日本製薬株式会社
東京都千代田区東神田 1 丁目 9 番 8 号
(72) 発明者 梶原 庸生
大阪府泉佐野市住吉町26番地 日本製薬株
式会社大阪工場内
(72) 発明者 松尾 宇人
千葉県成田市新京 3 番地の 1 日本製薬株
式会社成田工場内
(74) 代理人 弁理士 谷 良隆

(54) 【発明の名称】 プリオンの不活化方法

(57) 【要約】

【課題】 蛋白またはその含有物に混在するプリオンを蛋白の生理活性、特質、物性等を保持させながら不活化または感染力減衰化させること。

【解決手段】 液状のC₂-4アルケニルオキシド、特に液状エチレンオキシドによりプリオン混在蛋白またはその含有物を処理することにより、蛋白の生理活性、特質、物性等を保持させながらプリオンの感染力を有意に減衰させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】プリオンが混在する蛋白またはその含有物を液状の C_{2-4} アルケニルオキシサイドで処理することを特徴とするプリオンの不活化またはその感染力の減衰化方法。

【請求項2】 C_{2-4} アルケニルオキシサイドがエチレンオキシサイドである請求項1記載の方法。

【請求項3】 C_{2-4} アルケニルオキシサイドによる処理を $-10\sim-60^{\circ}\text{C}$ 、 $0.5\sim168$ 時間行う請求項1記載の方法。

【請求項4】液状の C_{2-4} アルケニルオキシサイドが水溶液である請求項1記載の方法。

【請求項5】処理すべき蛋白またはその含有物中の C_{2-4} アルケニルオキシサイド濃度が $0.05\text{v/v}\%$ 以上である請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、たとえば生理活性、特質等を有する蛋白またはその含有物や、たとえば食品素材用蛋白中に混在するプリオンを不活化またはその感染力を減衰させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒトを含む動物の組織や体液から、生理活性または特質を有する蛋白や食品素材用蛋白を調製する場合、それらの組織や体液中に混在している病原性粒子によって汚染される危険性がある。その汚染源の典型的な例がHIVウイルス、すなわちエイズウイルスである。しかしこのエイズウイルスについてはその性質が次第に解明され、不活化方法も確立されて血液製剤などヒトまたは動物組織や体液由来の蛋白製剤による新たな感染はほぼ確実に防ぐことができるようになってきた。ところが近年またプリオンという新しい病原因子がクローズアップされ世界を震撼させている。プリオンについてはまだ不明の点が多いが、核酸の存在が証明できないことにより、DNA又はRNAを持たない感染性蛋白といわれている。このプリオンを病原体とするヒトの疾病としては、これまでクールー、クロイツフェルト・ヤコブ病及びゲルストマン・シュトライスラー症候群などが知られており、ヒト以外ではヒツジやヤギにおけるスクレイビー、ウシにおける海綿状脳症（狂牛病）などが知られている。医原性クロイツフェルト・ヤコブ病は角膜移植や硬膜移植、ヒト脳下垂体から抽出した成長ホルモンの投与や汚染された脳波電極より患者に伝播された証拠がある。

【0003】この伝播性病原体はクールーの人の脳や脊髄に大量存在することが示されており、またクロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・シュトライスラー症候群の患者では、同様の伝播性病原体が脳、脾臓、肝臓、リンパ節、肺、脊髄、腎臓、角膜、レンズ、脳脊髄液、血液中から検出されている。しかしプリオンは抗体形

成のような免疫応答を生じないためワクチンは存在せず、罹患の診断も極めて困難である。プリオンを不活化する、または感染力を減衰させる方法についてはこれまで種々試みられてはいるが、この病原体は放射線、煮沸、乾熱、化学薬品（ホルマリン、ペーパークロビオラクトン、アルコール、ヨード、アセトン、過マンガン酸カリ、過酸化水素、酸化エチレンガス等）を含む従来の病原微生物に対する不活化法または感染力減衰法には極めて耐性がある。高温での高濃度の鉍酸またはアルカリ溶液による処理、次亜塩素酸-アルカリ溶液による処理、または高圧蒸気（ 134°C 、1時間）によりプリオンが不活化されることは知られているが、このような苛酷な条件での処理は蛋白を変性させ、たとえば蛋白質の生理活性や特質を消失させたり、物性を非可逆的に劣化させてしまう。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】このような状況下において蛋白またはその含有物に混在するプリオンを、蛋白の生理活性、特質、物性を保持させながら不活化もしくはその感染力を減衰させる方法の開発が待ち望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため従来この種の病原性粒子の不活化、感染力減衰化に用いられてきた方法を含め、多くの方法を検討したところ、ガス状では無効であったエチレンオキシサイドが、液状では実に効果的にプリオンを不活化または感染力を有意に減衰させ、しかも蛋白にはその生理活性、特質や物性を保持させることを知見し、さらに研究を押し進めて本発明を完成した。すなわち本発明は

(1) プリオンが混在する蛋白またはその含有物を液状の C_{2-4} アルケニルオキシサイドで処理することを特徴とするプリオンの不活化またはその感染力の減衰化方法、
(2) C_{2-4} アルケニルオキシサイドがエチレンオキシサイドである前記(1)記載の方法、(3) C_{2-4} アルケニルオキシサイドによる処理を $-10\sim-60^{\circ}\text{C}$ 、 $0.5\sim168$ 時間行う前記(1)記載の方法、(4) 液状の C_{2-4} アルケニルオキシサイドが水溶液である(1)記載の方法、(5) 処理すべき蛋白またはその含有物中の C_{2-4} アルケニルオキシサイド濃度が $0.05\text{v/v}\%$ 以上である(1)記載の方法、である。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明における液状アルケニルオキシサイド処理の対象物は、プリオンが混在する、またはその可能性のある蛋白またはその含有物である。それらには、たとえばインシュリン、グルカゴン、甲状腺刺激ホルモン、絨毛性性腺刺激ホルモン、カルシトニン、成長ホルモンなどのホルモン、たとえばプラスミノージェン、プラスミノージェンアクチベータ、ウロキナーゼなどの線溶因子、たとえば血液凝固第VII、VIII、IX、XI、X

II因子、フィブリノーゲン、トロンビンなどの血液凝固因子、たとえばアンチトロンビンIII、 α_1 -アンチトロンビン、プロテインC、プロテインSなどの血液凝固阻止因子、たとえばインターロイキン1~15、リンホカイン、腫瘍壊死因子、パーホリン、 α 、 β 、 γ -インターフェロンなどのサイトカインおよび各種抗体などの生理活性蛋白、それらを含む生体抽出組織またはその摩砕物やゼラチン、コラーゲン等の食品素材用蛋白またはこれらを含む食品素材などが含まれる。本発明に用いられるC₂₋₄アルケニルオキシサイドとしては、たとえばエチレンオキシサイド、プロピレンオキシサイド、ブチレンオキシサイドなどが挙げられる。その中で好ましいものはエチレンオキシサイドである。これらのアルケニルオキシサイドは溶液状態で使用される。溶液形成のために用いられる溶媒は通常水であるが、水にエタノール等の低級アルコールやその他の親水性有機溶媒を適量、たとえば10重量%以下の割合で混合したものであってもよい。処理対象物中のアルケニルオキシサイドの濃度は、0.05v/v%以上、通常0.1~1.0v/v%、好ましくは0.2~3v/v%、さらに好ましくは0.3~2v/v%、最も好ましくは0.7~1.5v/v%である。

【0007】この液状アルケニルオキシサイドによるプリオン混在蛋白またはその含有物の処理温度は、通常-10~60℃、好ましくは0~60℃、より好ましくは10~40℃、最も好ましくは15~30℃であり、処理時間は通常0.5~168時間、好ましくは1~120時間、より好ましくは10~108時間、最も好ましくは24~96時間である。本発明において用いられるプリオン不活化又は感染力減衰化処理条件下では、蛋白の生理活性、特質、物性等を保持させつつ、プリオンの感染力を有意に減衰させることができる。混在するプリオンを不活化または感染力を減衰化させるために用いられたアルケニルオキシサイドを処理物から除去するには自体公知の方法たとえば透析、膜濾過またはゲル濾過クロマトグラフィーなどにより行うことができる。本発明の効果は、スクレイビー感染マウス脳乳剤を液状アルケニルオキシサイドで処理したものおよび処理しないもののそれ

それをマウス脳に注射し、一定期間飼育・観察してその間の発症、斃死等の状況を把握することで確かめることができる。

【0008】

【実施例】以下に実施例をあげて本発明をさらに説明するが本発明はこれらによって制限されるものではない。

実施例1

1. 実験材料の調製

健康な食肉牛20頭から得られた混合牛血清を用い、以下の要領でサンプルAとサンプルBを調製した。

サンプルA

牛血清1Lに氷冷攪拌下液状エチレンオキシサイド(LEU)7mlを滴下し、滴下後25℃で約40時間放置した。これに硫酸アンモニウム351gを少しずつ加えて溶解させ、30分放置した後、生じた沈澱を濾取した。得られた固体を約100mlの蒸留水に溶解し、透析膜(ビスキング社製)に入れて、リン酸緩衝液(PBS(-))で透析した。透析内液を取り出し、蛋白量を120mg/mlになるようにPBS(-)で調整した。メンブランフィルター(0.22 μ m、ミリポア社製)で除菌濾過し、LEO処理グロブリン分画を得た。これをサンプルAとした。

サンプルB

牛血清1Lに硫酸アンモニウム351gを少しずつ加えて溶解させ、30分放置の後、生じた沈澱を濾取した。得られた固体を約100mlの蒸留水に溶解し、透析膜(ビスキング社製)に入れて、PBS(-)で透析した。透析内液を取り出し、蛋白量が120mg/mlになるようにPBS(-)で調整した。メンブランフィルター(0.22 μ m、ミリポア社製)で除菌濾過し、LEO未処理グロブリン分画を得た。これをサンプルBとした。

【0009】2. 中和抗体価の測定方法

蛍光中和抗体法(Fluorescent-focus neutralization test)により測定し、60%以上ロタウイルスの増殖を阻止したサンプルの希釈倍数の逆数を抗ロタウイルス中和抗体価とし(表1)に示した。

【表1】

| ウイルス | 血清型 | 抗ロタウイルス中和抗体価 | |
|----------|-----|--------------|-------|
| | | サンプルA | サンプルB |
| ヒトロタウイルス | 1型 | 80 | 40 |
| ヒトロタウイルス | 2型 | 40 | 80 |
| ヒトロタウイルス | 3型 | 160 | 160 |
| イヌロタウイルス | 3型 | 1,280 | 1,280 |
| ブタロタウイルス | 5型 | 80 | 80 |
| ウシロタウイルス | 6型 | 1,280 | 1,280 |

【表1】から明らかとなっており、LEO処理により中和抗体価は低下せず、グロブリンの活性に影響のないことが確

かめられた。

【0010】実施例2

1. 実験材料の調製

健康な食肉牛それぞれ20頭から得られた混合牛血清を3ロット用意し、以下の操作によりサンプルC、D、Eを調製した。

各サンプルの調製

牛血清1Lに硫酸アンモニウム351gを少しずつ加えて溶解させ、30分放置した後、生じた沈澱を濾過により除去した。得られた上清液にさらに硫酸103gを少しずつ加えて溶解させ、30分放置の後、生じた沈澱を濾過により集めた。得られた固体を約100mlの蒸留水に溶解し、氷冷攪拌下LEUを0.7ml滴下し、滴下後25℃で約40時間放置した。これを透析膜（ビスキング社製）に入れて、生理食塩液で透析した。透析内液を取り出し、蛋白量が100mg/mlになるように生理食塩液で調整した。メンブランフィルター（0.22μm、ミリポア社製）で除菌濾過し、動物細胞培養用組成物を得た。この組成物を蛋白量にして3mg/mlになるようにダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）ノハム12培地（F12）（DMEM/F12）（1:1）の基礎培地300mlに加え、さらにインシュリン3mg、トランスフェリン6mg、エタノールアミン36.6μg、亜セレン酸ナトリウム1.4μgを添加し、メンブランフィルタ

ー（0.22μm、ミリポア社製）で除菌濾過し、動物細胞培養用培地サンプルを得た。3ロットそれぞれに以上の操作を施し、サンプルC、D及びEとした。

【0011】2. 測定方法

サンプルC、D、E及び牛胎児血清（FBS）（LEU未処理）を10%v/vとなるようにDMEM/F12（1:1）の基礎培地で調整したものを対照培地として用いた。細胞は、チャイニーズハムスターの腎細胞であるCHO-K1細胞（大日本製薬社製）と、ハムスターの腎細胞であるBHK-21細胞（大日本製薬社製）を使用した。サンプルC、D、E及び対照培地を各々24穴マルチディッシュに1ml/ウエルずつ分注した後、各細胞浮遊液（細胞数 $2.4 \sim 2.6 \times 10^4$ /ml）を0.1mlずつ分注し、5%CO₂インキュベーターで37℃で7日間培養した。培養後、各ウエルの培地を廃棄後0.25%トリプシン溶液で細胞を剥離し、コールターカウンターで細胞数を測定した。細胞増殖促進効果は、対照培地の細胞増殖率（培養後の細胞数÷培養開始時の細胞数）を100としたときの各サンプルの細胞増殖率で示した。その結果を〔表2〕に示した。

〔表2〕

| 細胞 | 対照培地 | 細胞増殖率(%) | | |
|----------|------|----------|-------|-------|
| | | サンプルC | サンプルD | サンプルE |
| CHO-K1細胞 | 100 | 116 | 78 | 99 |
| BHK-21細胞 | 100 | 110 | 77 | 74 |

上記〔表2〕から明らかなとおり、LEU処理した動物細胞培養用組成物は、10v/v% FBSを使用した対照培地に比べ遜色のない細胞増殖促進効果を示した。

【0012】実施例3

1w/v%スクレイビー感染マウス脳乳剤に、LEUを2v/v%になるように添加し、25℃で90時間放置した後に透析したLEU処理群と、LEUを添加せずに25℃で90時間

放置した後に透析したLEU無処理群、及び10w/v%スクレイビー感染マウス脳乳剤を10⁵倍まで10倍段階で希釈した各感染価測定群のそれぞれを1cR系生後4週齢のマウスに投与して、スクレイビーの発症、斃死を観察した。なお、脳乳剤のマウスへの投与は0.02mlを脳内に接種した。

〔表3〕

接種後339日経過時の生存数

| 試験群 | スクレイビー感染マウス 10w/v%脳乳剤希釈倍数 | 接種 匹数 | 死亡 匹数 | 死亡率 (%) | 潜伏期 (日) | 感染単位 (log ₁₀) |
|--------|------------------------------|----------|----------|------------|------------|------------------------------|
| | | | | | | |
| LEU処理群 | 10 ¹ | 10 | 5 | 50 | 304±14 | <-0.2 |
| | 10 ¹ | 9 | 9 | 100 | 161±7 | <4.9 |
| 感染価測定群 | 10 ² | 4 | 4 | 100 | 167±7 | 5.5 |
| | 10 ³ | 5 | 5 | 100 | 166±9 | 4.5 |
| | 10 ⁴ | 5 | 5 | 100 | 171±6 | 3.5 |
| | 10 ⁵ | 5 | 5 | 100 | 181±9 | 2.5 |
| | 10 ⁶ | 5 | 5 | 100 | 203±5 | 1.5 |
| | 10 ⁷ | 4 | 4 | 100 | 228±7 | 0.5 |
| | 10 ⁸ | 6 | 0 | 0 | >339 | -0.5 |

感染対照群の結果から、接種後339日経過の時点で、スクレイビー感染マウス10w/v%脳乳剤の10⁵倍希釈液接種マウスが100%斃死し、10⁶倍希釈液接種マウスに斃死が確認されていないことから、スクレイビー感染マウス10

w/v%脳乳剤の50%致死率（LD₅₀）を、10^{6.5}倍希釈液とし、これを5.5（log₁₀）感染単位とした。

【0013】感染対照群の潜伏日数と感染単位から試験群の感染単位を求める標準曲線を作成し、試験群の潜伏

日数から感染単位を測定したところ、次のような結果が得られた。

処理群の感染単位 (\log_{10}) = -0.2

未処理群の感染単位 (\log_{10}) = 4.9

これらから、LEO 処理による感染単位の減衰値 (\log_{10}) は $4.9 - (-0.2) = 5.1$ (\log_{10}) = $10^{5.1}$ となる。即ち、LEO 処理することにより、スクレイビー感染マウス100/1% 脳乳剤を $10^{5.1} = 1.26 \times 10^5$ 倍に希釈した液と同等の感染単位にまでプリオンの感染力を減衰せしめたこと

になる。

【0014】

【発明の効果】本発明において、従来法による細菌、ウイルスの失活法に強い抵抗性を示すプリオンを、蛋白の生理活性、特質や物性等を保持させる緩和な条件下において効果的に不活化ないしはその感染力を有意に減衰させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】は感染単位を求める標準曲線を示す。

【図1】

